

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-119279

(P2002-119279A)

(43) 公開日 平成14年4月23日 (2002. 4. 23)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/02		C 0 7 D 319/24	4 B 0 2 4
C 0 7 D 319/24		C 0 7 K 16/44	4 B 0 5 0
C 0 7 K 16/44		C 1 2 N 9/08	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		9/38	4 B 0 6 5
9/08		C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数24 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-315948(P2000-315948)

(22) 出願日 平成12年10月16日 (2000. 10. 16)

(71) 出願人 500481031

財団法人食品薬品安全センター

東京都港区虎ノ門一丁目15番12号

(72) 発明者 松木 容彦

神奈川県秦野市落合729-5 財団法人食

品薬品安全センター 秦野研究所内

(72) 発明者 神戸川 明

東京都狛江市市元泉3-8-5 神戸川研

究所内

(74) 代理人 100089314

弁理士 大多和 明敏 (外1名)

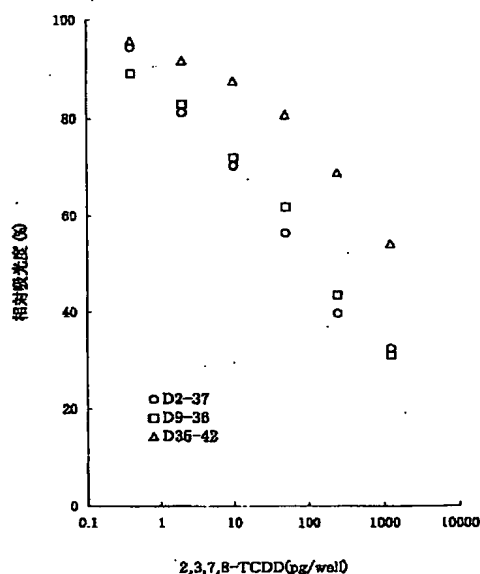
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ダイオキシンに対するモノクローナル抗体及びその用途

(57) 【要約】

【課題】 ヒトの生体試料中ダイオキシン類の簡易でかつ高感度な酵素イムノアッセイ法を確立する。

【解決手段】 ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体により、ヒトの生体試料中のダイオキシン類を酵素イムノアッセイ法により検出、測定する。



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体。

【請求項2】ダイオキシン類が、ポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシン又はポリハロゲン化ジベンゾフランである請求項1記載のモノクローナル抗体。

【請求項3】ダイオキシン類が、下記(1)～(7)のポリハロゲン化-p-ダイオキシン又は下記(8)～(17)のポリハロゲン化ジベンゾフランである請求項1又は2記載のモノクローナル抗体。

(1) 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(2378TCDD)、(2) 1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(12378PeCDD)、(3) 1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123478HxCDD)、(4) 1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123678HxCDD)、(5) 1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(123789HxCDD)、(6) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(1234678HpCDD)、(7) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(12346789OCDD)、(8) 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン(2378TCDF)、(9) 1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(12378PeCDF)、(10) 2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン(23478PeCDF)、

(11) 1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン(123478HxCDF)、(12) 1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン(123678HxCDF)、(13) 1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾフラン(123789HxCDF)、(14) 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン(234678HxCDF)、

(15) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾフラン(1234678HpCDF)、(16) 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-ヘプタクロロジベンゾフラン(1234789HpCDF)、(17) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾフラン(12346789OCDF)。

【請求項4】更に、(2)、(8)または(10)との親和性が大である請求項3記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)、(10)との交差率が0.5前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)との交差率が0.2前後、(8)、(10)との

交差率が0.3前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】(1)との親和性を1.0とした場合、(2)との交差率が1.0前後である請求項4記載のモノクローナル抗体。

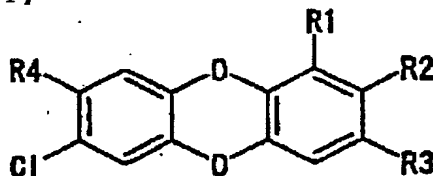
【請求項8】ハイブリドーマD9-36(FERM P-18057)から生産されるものである請求項5記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】ハイブリドーマD2-37(FERM P-18056)から生産されるものである請求項6記載のモノクローナル抗体。

【請求項10】ハイブリドーマD35-42(FERM P-18058)から生産されるものである請求項7記載のモノクローナル抗体。

【請求項11】以下の式で表わされるハプテンと蛋白との結合物で動物を免疫し、該動物から抗体製造細胞を得、前記細胞を腫瘍細胞と融合させて複数のハイブリドーマ(混合種)を生成させ、該複数のハイブリドーマからダイオキシン類と反応する抗体を製造する少なくとも1種のハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマから製造された抗体類を回収することを特徴とする、請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【化1】



式中、R1はNHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCOCH=CHCOOH、CH=CHCOOH、CH=C(CH<sub>3</sub>)COOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOH、Hから選ばれる官能基であり、R2はH、Cl、OCH<sub>2</sub>COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、CH=CHCOOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOHから選ばれる官能基であり、R3はClまたはHであり、R4はCl、CH<sub>3</sub>またはC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>である。

【請求項12】請求項11で用いるハプテン-蛋白結合物における蛋白がウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、スカシ貝ヘモシアニンである請求項11記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項13】ハイブリドーマがD9-36(FERM P-18057)、D2-37(FERM P-18056)又はD35-42(FERM P-18058)である、請求項11記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項14】請求項11において得られる、請求項1、2、3、4、5、6又は7記載のモノクローナル抗

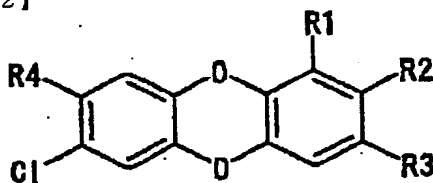
体を産生するハイブリドーマ。

【請求項15】D9-36 (FERM P-18057)、D2-37 (FERM P-18056) 又はD35-42 (FERM P-18058) である、請求項14記載のハイブリドーマ。

【請求項16】請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体を用いる免疫酵素測定法によるダイオキシン類の検出、測定方法。

【請求項17】以下の式で表わされるハプテンと酵素とを結合させた、ダイオキシン類のアッセイ系に用いる酵素標識ハプテン。

【化2】



式中、R1はNHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH、NHCOCH=CHCOOH、CH=CHCOOH、CH=C(CH<sub>3</sub>)COOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOH、Hから選ばれる官能基であり、R2はH、Cl、OCH<sub>3</sub>、COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH、CH=CHCOOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOHから選ばれる官能基であり、R3はClまたはHであり、R4はCl、CH<sub>3</sub>またはC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>である。

【請求項18】酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼである請求項17記載の酵素標識ハプテン。

【請求項19】1) (1) 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体に対する抗体を固定化した固相、(2) 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体、(3) ダイオキシン類を含む試料と(4) 請求項17記載の酵素標識ハプテンとを反応させ、2) 固相に固定化された標識酵素活性を測定することにより試料中のダイオキシン類の濃度を測定することの特徴とする、請求項16記載のダイオキシン類の検出、測定方法。

【請求項20】1) (1) 請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体を固定化した固相、(2) ダイオキシン類を含む試料と(3) 請求項17記載の酵素標識ハプテンとを反応させ、2) 固相に固定化された標識酵素活性を測定することにより試料中のダイオキシン類の濃度を測定することの特徴とする、請求項16記載のダイオキシン類の検出、測定方法。

【請求項21】ダイオキシンの高純度化に用いる組成物

であって、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体を含んでなる組成物。

【請求項22】ダイオキシンの生化学的、免疫学的、機能的、又はその他の研究分析法で用いる組成物であって、有効量の請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体を含んでなる組成物。

【請求項23】試料中のダイオキシン類の存在又は濃度の測定用キットであって、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体、請求項17記載の酵素標識ハプテンを含有するキット。

【請求項24】請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体に対する抗体、請求項1、2、3、4、5、6、7、8、9または10記載のモノクローナル抗体、請求項17記載の酵素標識ハプテンを含有する試料中のダイオキシン類の存在又は濃度の測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はダイオキシン類に対するモノクローナル抗体、特にダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体に関するものである。本発明は又、該モノクローナル抗体の製造法、該モノクローナル抗体を用いるダイオキシン類の検出、測定法、そのためのキットに関するものである。

【0002】

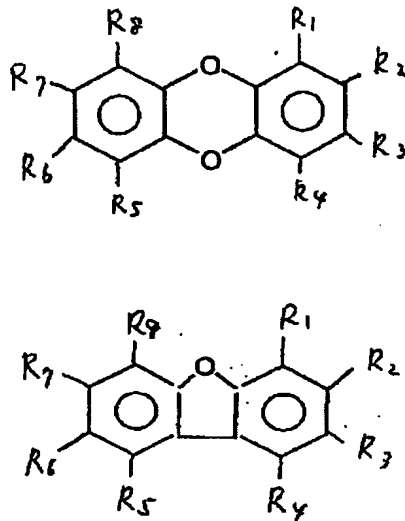
【従来の技術】近年、化学物質による環境汚染とそれらのヒト健康への影響の懸念から、大気、焼却灰、排ガス、排水、常水、食物等に含まれるダイオキシンについては、日本のみならず世界各国においても社会関心事であり、環境汚染物としてのダイオキシン類が生物、人類に対して及ぼす持続性の毒性の脅威が言われている。ダイオキシン類は廃棄物の熱を伴う処理過程や有機塩素化合物の生産過程等で生成する非意図的な化学物質であるが、発生源が多岐にわたり、その環境汚染が大きな問題となってきたため、これらによるヒトでの曝露、生態系や食物の汚染状況を調査することは急務となっている。ダイオキシン類の発生毒性は生体の毒性に比べて感受性が高いうえ、その影響は多くの場合不可逆的でしかも次世代に及ぶという大きな問題がある。なかでも妊娠中及び授乳中の母親が曝露されることによる子への影響は非常に低濃度のダイオキシンによっても現れる可能性があるため、その被曝量を的確かつ迅速にモニターし得る微量定量法の確立が切望されている。多種類の汚染物質が混在している試料について特定のダイオキシン類を高感度、高精度で測定するには、従来、高分解能ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー(HRGS/HRMS)が用いられてきた。しかし、HRGS/HRM

Sで測定するには、どの試料においても他段階で煩雑なクリーンアップ操作を要し、良く整備された実験室で高価な装置を用い、熟達した研究者が長時間に亘って作業する必要があるため、その費用は著しく高価なものとなっている。今後、ダイオキシン類の測定対象試料種や数は益々増加することが予測されることから、安価で簡便かつ高感度な測定法の開発が強く望まれている。このH R G S / H R M S に代る方法の一つに免疫測定法がある。この方法によるダイオキシンの測定はいくつか報告されているが、高濃度のダイオキシンを含む試料（環境試料や標準溶液）についてであり（Kennel, S. J. ら, Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986, 82, 256-263; Stanker, L. H. ら, Toxicology. 1987, 45, 229-243; Vanderlaan, M. ら, Toxicol. Chem. 1988, 7, 859-870; Sugawara, Y. ら, Anal. Chem. 1998, 70, 1092-1099; Sanborn, J. R. ら, J. Agric. Food Chem. 1988, 46, 2407-2416; Harrison, R. O. ら, Organohalogen Compounds 1999, 36, 129-132; Zenn\*

\* egg, M. ら, Organohalogen Compounds 1999, 36, 317-319)、測定が求められているヒト母乳や血液などダイオキシン含量の低い生体試料についてはほとんど報告がない。

【0003】ダイオキシン類について更に説明すると、ダイオキシン類は以下の式（a）に示すダイオキシン〔ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン（PCDDs）〕および式（b）に示すポリ塩化ジベンゾフラン（PCDFs）を指すが、これらは3環性塩素化合物で、置換塩素の数や位置の違いにより多くの構造異性体が存在し、各々、生物学的作用や物理化学的性質は類似しているものや全く異なるものがあり、各異性体で毒性も著しく変ってくる。このように毒性が異性体や同族体間で大きく異なるので、実測濃度で毒性を評価することは困難である。

【化3】



$R_1 \sim R_8$ : HまたはCl

但し全てがHである場合を除く。

【0004】ダイオキシン類の構造異性体には75種のポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン（PCDDs）と135種のポリ塩化ジベンゾフラン（PCDFs）があるが、各異性体間の毒性は大きく相違するため、最も毒性の強い2, 3, 7, 8-TCDDに対する毒性を1としたときの相対毒性、毒性等価係数（Toxic Equivalency Factor; TEQ）が提唱され、毒性の強い7種のPCDDsおよび10種のPCDFsが測定対象とされている。また、以前から環境中の汚染物質として知られていたポリ塩化ビフェニール（PCBs）のうち4種のノンオルトPCBsと8種のモノ

40 オルトPCBsもダイオキシンと同様の生物作用を示す化合物として測定されているようになってきた。そこで、ダイオキシン類の評価には、各異性体の実測濃度にTEFを乗じた値の総和を2, 3, 7, 8-TCDD毒性等価量（Toxic Equivalent quantity; TEQ）に換算し、この値を用いて毒性評価が行われる。

【0005】ごく最近になって母乳中のダイオキシン類のTEQの大部分は、（1）2, 3, 7, 8-TCDD、（2）1, 2, 3, 7, 8-PeCDDおよび（10）2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの3種で占められ

ていることが明らかになり、これらに親和性の高い抗体を用いる酵素イムノアッセイ（ELISA）でダイオキシン類の毒性を評価できることが示された（Nakazawa, H. ら、Organohalogen Compounds 2000, 45, 86-89; Saito, K. ら、Organohalogen Compounds 2000, 45, 168-171; Sugawara, Y. ら、Organohalogen Compounds 2000, 45, 172-175）。しかし、ここで用いた抗体はウサギのポリクローナル抗体であるため、産生もしくは入手時のロット差のない抗体を大量に供給することは不可能であり、その測定法ならびに測定結果の安定性、普遍性に問題があった。また、同一ロットの抗血清を用いても、反応に関与する抗体種（クロノタイプ）が複数混在するため、測定試料によっては反応する抗体種が異なり、測定値が変動する場合もある。上記のポリクローナル抗体を用いる方法の欠点を改良すべく、ダイオキシン類に対するモノクローナル抗体やそれを用いるダイオキシン類の測定法も提案されている〔特開昭63-14691号公報（USP 4, 798, 807号）、特開昭63-74494号公報参照〕。しかしながらこれらのモノクローナル抗体はダイオキシン類に対する特異性、抗ダイオキシン抗体価に関する情報が不明確であり、測定法としては、特開昭63-74494号公報記載のものは、他のダイオキシン同族体との交差反応性が示されていないので、この抗体を使って求めた測定結果を毒性の観点からは評価することができないし、特開昭63-14691号のものは、毒性の最も強い2,3,7,8-TCDDより他のダイオキシン同族体に親和性が高いため、同族体の混合比が異なる実試料の測定値は毒性等価量と相関しないという欠点がある他、両者とも2,3,7,8-TCDDの定量限界が1ng前後であり、生体試料など微量のダイオキシンを含む実試料の定量には使用できない、等で問題があり実用性に欠けるものであった。

#### 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヒトの生体試料中のダイオキシン類の簡易でかつ高感度な酵素イムノアッセイ法（ELISA）を確立し、特にヒトでのダイオキシンによる汚染のモニタリングや状況調査に資する方法を提供することを目的とし、そのために適したモノクローナル抗体を提供することを課題とするものである。

#### 【0007】

【課題を解決するための手段】中澤らは、ELISA法による測定対象の選択とその適切性について確認するため、HRGC/MSにより測定し得られたヒト母乳中のダイオキシンの同族体の各測定結果と毒性等価係数（TEF）をもとに算出した毒性等価量（TEQ）との相関性について調べた。その結果、特に（2）1, 2, 3, 7, 8-PeCDDと（10）2, 3, 4, 7, 8-PeCDFの2種が特にTEQとの相関が優れており、TEFの高い2, 3, 7, 8-TCDDを含めた3種をE

LISAで測定できれば、毒性等量換算値としてのヒトでのダイオキシン曝露評価ができることが確認された。本発明者らは上記3種に特異的なモノクローナル抗体を得るべく研究を重ねた結果、ダイオキシン類中2, 3, 7, 8-TCDDに最大の親和性を有する新規なモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明に到達したものである。

【0008】即ち、本発明はダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大であるモノクローナル抗体に関するものである。本発明においてダイオキシン類とは、ポリハロゲン化ジベンゾ-p-ダイオキシン又はポリハロゲン化ジベンゾフランを指し、これらの具体例としては、下記（1）～（7）のポリハロゲン化-p-ダイオキシン又は下記（8）～（17）のポリハロゲン化ジベンゾフランがあげられる。

（1）2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（2378TCDD）、（2）1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（12378PeCDD）、（3）1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（123478HxCDD）、（4）1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（123678HxCDD）、（5）1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（123789HxCDD）、（6）1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（1234678HpCDD）、（7）1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン（12346789OCDD）、（8）2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン（2378TCDF）、（9）1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン（12378PeCDF）、（10）2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフラン（23478PeCDF）、（11）1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン（123478HxCDF）、（12）1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン（123678HxCDF）、（13）1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾフラン（123789HxCDF）、（14）2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン（234678HxCDF）、（15）1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾフラン（1234678HpCDF）、（16）1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-ヘプタクロロジベンゾフラン（1234789HpCDF）、（17）1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾフラン（12346789OCDF）。本発明は（1）の2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに最大の親和性を有し、更に（2）の1, 2, 3, 7,

10

20

30

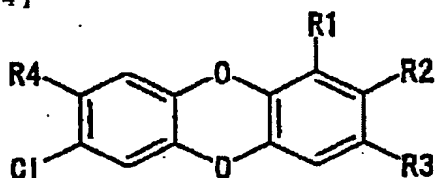
40

50

8-ベンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、(8)の2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン、及び/又は(10)の2, 3, 4, 7, 8-ベンタクロロジベンゾフランとの親和性が大であるモノクローナル抗体を提供するものである。本発明はまたハイブリドーマD9-36 (FERM P-18057)、ハイブリドーマD2-37 (FERM P-18056) またはハイブリドーマD35-42 (FERM P-18058) から生産されるモノクローナル抗体を提供するものである。

【0009】本発明は又、以下の式で表わされるハプテンと蛋白との結合物で動物を免疫させ、該動物から抗体製造細胞を得、前記細胞を腫瘍細胞と融合させて複数のハイブリドーマを生成させ、該複数のハイブリドーマからダイオキシン類と反応する抗体を製造する少なくとも1種のハイブリドーマを選択し、該ハイブリドーマから製造された抗体類を回収することを特徴とする、モノクローナル抗体の製造方法に関するものである。

【化4】



式中、R1はNHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、HCOCH=CHCOOH、CH=CHCOOH、CH=C(CH<sub>3</sub>)COOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOH、Hから選ばれる官能基であり、R2はH、Cl、OCH<sub>3</sub>、COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、CH=CHCOOH、(CH=CH)<sub>2</sub>COOHから選ばれる官能基であり、R3はClまたはHであり、R4はCl、CH<sub>3</sub>またはC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>である。上記ハプテンと結合させる蛋白としては、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミン、スカシ貝ヘモシアニン等が挙げられる。また本発明は上記のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマに関し、特にD9-36 (FERM P-18057)、D2-37 (FERM P-18056) 又はD35-42 (FERM P-18058) で表わされるハイブリドーマに関するものである。更に、本発明は本発明のモノクローナル抗体を用いる免疫酵素測定法によるダイオキシン類の検出、測定方法、本発明のモノクローナル抗体を含有するダイオキシンの高純度化組成物、本発明のモノクローナル抗体を含有するダイオキシンの生化学的、免疫学的、機能的、又はその他の研究分析法で用いる組成物に関するものである。また本発明のモノクローナル抗体、酵素標識ハプテンを含有する試料中のダイオキシン類の存在又は濃度の測定用キットに関するものである。本発明のモノクローナル抗

体類は、試料中に含有されているダイオキシン類の同定のために用いることができ、試料中のダイオキシン類の濃度測定に用いることができる。対象試料としては、土壌、水、大気や飛灰等の環境試料及び血液や母乳等の生体試料等を挙げることができる。

【0010】ダイオキシン類の存在又は濃度を測定するための種々の免疫分析法における試薬として用いた場合、本発明のモノクローナル抗体類の使用により分析法は改善される。検出はより便利に、また迅速、鋭敏になると共に、特異性が高くなる。本発明のモノクローナル抗体類を使用できる免疫分析法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)(放射線免疫分析)、競合免疫沈殿分析、酵素連結免疫吸着分析(ELISA)及び免疫蛍光分析を挙げることができるが、これらの免疫分析法のみに限定されるものではない。本発明では特に免疫酵素測定法に用いるのが好ましく、その際、擬似抗原を固定し、試料中のダイオキシン類とモノクローナル抗体との反応を競合させる間接競合法と、抗体を固定し試料中のダイオキシン類と酵素標識ハプテンとの反応割合を見る直接競合法とが挙げられる。後者では抗体として本発明のモノクローナル抗体を用いることもできるが、マウスIgGに対する第2次抗体を固定し、試料、モノクローナル抗体、酵素標識ハプテンと接触させる方法が、その再現性、簡便性、感度等の点ですぐれていて好ましい。ハプテンを標識するための酵素としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ等が挙げられる。

【0011】試料中のダイオキシン類の存在又は濃度を検定ないし測定する本発明による組成物は、化学物質の存在を検出するために有効な濃度の抗体又は化学物質量の定量をするために有効な濃度の抗体を含有している。ラテックス粒子又はプラスチック・マイクロタイター・プレートのような適当な担体と抗体とを混合又は抗体をこれらの担体に付着させておいてもよい。用いる免疫学的方法に応じて、抗体に酵素もしくは色素を配合することもでき、放射能標識を付すこともできる。従って、2, 3, 7, 8-TCDDを含むダイオキシン類と反応するモノクローナル抗体類を用いる分析法は全て本発明の技術的範囲に包含される。本発明のモノクローナル抗体類は、選択的免疫反応に基づいて、複雑な混合物又は溶液からダイオキシン類を測定、単離、純化及び/又は、除去するために使用できる。ダイオキシン類と反応するモノクローナル抗体の使用により、従来法は著しく改良される。これらのモノクローナル抗体類を上記の反応に用いて有用性が発揮される特性は、ポリクローナル抗体類と比較した場合に認められる顕著な特異性と、大規模な工業的ないし商業的な規模での均質な抗体の使用を可能にし、実際上量的に制限なく入手できることである。

【0012】たとえば本発明のモノクローナル抗体を用

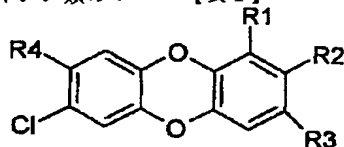
いて、その他のダイオキシン類又は類似有機化合物類の混合物から例えば2, 3, 7, 8-TCDDを分離し純化することができる。混合物を、固定化された本発明のモノクローナル抗体と接触させると、抗体の結合した2, 3, 7, 8-TCDDの固定複合体が形成されて2, 3, 7, 8-TCDDが混合物から分離されて、混合物を除去した後、2, 3, 7, 8-TCDDを抗体から分離し、公知の技術により高純度のものを回収する。複雑な混合物からダイオキシン類を純化ないし回収するために用いる本発明による組成物は、許容できる器材上に固定するか或いは許容できる担体と混合させて、ダイオキシン類との反応及び結合が可能な状態の有効量の本発明のモノクローナル抗体を含有する。本発明のモノクローナル抗体類は、ダイオキシン類の構造及び作用機能に関係した研究のための有用な試薬でもある。本発明の抗体類の持つ鋭敏な特異性のために、ダイオキシン類の\*

\*免疫化学的分析及び構造活性分析に使用することが可能になり、特異性に乏しい従来法のポリクローナル抗体類と比較して上記の如き応用により適したものとなる。研究試薬として使用する本発明による組成物は、ダイオキシン類との混合及びそれに続く分析によって情報を提供する効果を発揮する量の抗体を含有する。その量については適宜決めることができるものである。

【0013】本発明の新規モノクローナル抗体の作製とELISA法の構築について更に詳しく述べると以下の通りである。

1) ハプテン抗原、タンパク結合物および標識体の合成  
ダイオキシン骨格のC-1またはC-2に、末端にカルボキシル基を有し、酸アミド、エーテルあるいは二重結合を介した長さの異なるスペーサーを導入した表1に示すハプテン抗原を十数種合成した。

【表1】



ハプテン	R1	R2	R3	R4
I-1	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-2	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-3	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I-5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I-6	CH=C(CH <sub>3</sub> )COOH	Cl	Cl	Cl
I-7	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-8	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-9	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-10	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
II-1	H	OCH <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II-2	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl
II-3	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl
II-4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II-5	H	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II-6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II-6M	H	CH=CHCOOH	H	CH <sub>3</sub>
II-6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

これらの中から数種のハプテンを選び、活性エステル法によりウシ血清アルブミン(BSA)との結合物を、また一方、西洋ベルオキシダーゼ(HRP)と反応させ数種の酵素標識体を得た。

【0014】2) モノクローナル抗体

ハプテン4種(I-2、I-3、I-5、II-2)のBSA結合物をBALB/c又はA/Jマウスに反復免疫投与し、血清中の抗ダイオキシン抗体価が良好な結果を与えた個体に

ついて、さらにTMDDによる阻害効果により抗体の親和力について調べた。ついで、良好な結果が得られたBALB/cマウス2匹とA/Jマウス1匹から得られた脾細胞とP3/NS1/1-Ag4-1ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールを用いて融合し、HAT選択培養により得られた融合細胞の培養上清をELISAによりスクリーニングした。その結果、200種前後のハイブリドーマが抗ダイオキシン抗体を分泌しているこ

とが示された。

3) TMDD及び2, 3, 7, 8-TCDDによる阻害効果が大きい抗体を産生するハイブリドーマを選択し、得られたハイブリドーマをクローニングしてモノクローナル抗体を調製し、その諸性質を詳細に検討した結果、ダイオキシン類の1又はそれ以上に特異的であるモノクローナル抗体であって、ダイオキシン類の内、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシンに親和性が最大である新規なモノクローナル抗体を得ることに成功した。

本発明のモノクローナル抗体中には、更に(2)の1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、(8)の2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン、及び/又は(10)の2, 3, 4, 7, 8-ペンタクロロジベンゾフランとの親和性が大であるものもある。

#### 【0015】

【実施例】I. 実験を行うにあたっての各種条件は下記の通りであった。

#### 1. 実験材料

1) ハプテン-ウシ血清アルブミン(BSA)結合体及びペルオキシダーゼ(HRP)標識ハプテン  
先の表1に示した4種ハプテン(I-2, I-3, I-5, II-2)のBSA結合体、及び8種ハプテン(I-2, I-3, I-5, I-6, I-7, I-10, II-4, II-6)のHRP標識体を用いた。

#### 2) マウス

BALB/c及びA/Jマウス(いずれも雌、8週齢)は、日本SLCより購入した。

#### 3) ミエローマ細胞株

P3/NS1/1-Ag4-1 ミエローマ細胞株は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから供与された。

#### 【0016】2. 試薬と器材

#### 1) 免疫・ELISA関係

Freundの完全及び不完全アジュバント: DIFCO 0638-60-7及び0639-60-6

アフィニティー精製ウサギ抗マウスIgG+IgM抗体(第二抗体): ジャクソン 315-005-044

1, 2, 7-三塩化-8-メチルダイオキシン(TMDD): Wellington Laboratories

o-フェニレンジアミン二塩酸塩: Sigma P9029

30% 過酸化水素水: 和光純薬工業

ELISA用マイクロタイタープレート: 住友ベークライト MS-9596F

#### 2) 細胞融合関係

RPMI 1640粉末培地: GIBCO-BRL 31800-022

ウシ胎児血清(FCS): GIBCO-BRL 26140-079

ハイブリドーマクローニングファクター(HCF): IGEN

HAT Media Supplement: Sigma H0262

ポリエチレングリコール4000(PEG): Merck Art 9727

ジメチルスルホキシド(DMSO): Sigma D2650

培養フラスコ(25 cm<sup>2</sup>): 岩城硝子3100-025

培養フラスコ(75 cm<sup>2</sup>): Becton Dickinson 3824

クラスターディッシュ(96ウエル): Costar 3598

その他の塩類・有機溶媒などは、試薬特級を用いた。

#### 3. 機器

ELISAプレートリーダー(BL 312e): Bio-Tek Instrument Inc.

#### 4. 免疫及び試験採血

10 上記4種ハプテン(I-2, I-3, I-5, II-2)のBSA結合体の各々を、以下の手順でBALB/cマウス及びA/Jマウス各5匹に繰り返し免疫投与した。ハプテン-BSA結合体(50 µg)を滅菌生理食塩水(0.1 mL)に溶解し、完全アジュバント(0.1 mL)とのエマルジョンとして、上記マウスのfoot pad(片足につき1カ所)及び背部(体毛をバリカンで除去して20カ所程度)に皮下投与した。以後、同量の免疫原を不完全アジュバントとのエマルジョンとして6~8回の追加免疫を行った。5~7回目の追加免疫より7日後に眼静脈よりヘマトクリット管を用いて試験採血(20-40 µL)した。得られた血液から常法により血清を分離し、そのHRP標識ダイオキシンとの反応性を、下記のELISA法により調べた。

#### 【0017】5. ELISA

#### 1) 緩衝液と基質溶液

PBS: 0.9% NaClを含む0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 緩衝液(pH 7.3)。

基質溶液: 0.05% o-Phenylenediamine・HCl及び0.01% 過酸化水素を含む50 mmol/Lクエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)。

#### 2) 第二抗体固定化プレートの調製

30 96穴ELISA用マイクロタイタープレートの各ウエルに、第二抗体のPBS溶液(2 µg/mL)を分注(100 µL/well)して、4℃で一夜放置。抗体溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄。BSA(0.5%)のPBS(150 µL/well)をウエルに分注して、室温で2-3時間放置。溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄して第二抗体固定化プレートを作製した。

#### 3) ELISAの方法

40 第二抗体固定化プレートに0.1%ゼラチンを含むPBSで希釈したマウス血清、ハイブリドーマ培養液またはマウス腹水及び酵素標識ダイオキシンを添加し(阻害試験ではダイオキシンの標準溶液も添加する)(100 µL/well)、4℃で一夜放置。溶液を吸引除去したのち、PBSでウエルを3回洗浄し、基質溶液を添加し(100 µL/well)、室温で30分ないし1時間放置。3 mol/L硫酸(50 µL/well)を加えて酵素反応を停止したのち、490 nmの吸光度をプレートリーダーにより測定した。

#### 【0018】6. 細胞融合によるモノクローナル抗体の調製

#### 1) 培地

50 基本培地: 10 mmol/L HEPES-NaOH緩衝液(pH 7.3)及び



硫酸カナマイシン (0.06%) を含む RPMI-1640。

培養培地: 10 % FCS、0.05 mmol/L 2-メルカプトエタノール、2 mmol/L L-グルタミン及び 1 mmol/L ビルビン酸ナトリウムを含む基本培地。

HAT培地: 0.01 mmol/L ヒポキサンチン、16  $\mu$ mol/L チミジン及び 0.4  $\mu$ mol/L アミノプテリンを含む培養培地。

HT培地: 0.01 mmol/L ヒポキサンチン、16  $\mu$ mol/L チミジンを含む培養培地。

## 2) PEG溶液

PEG (40 g) をダルベッコPBS (-) (50 mL) に溶解し、DMSO (10 mL)、0.1% ポリ-L-アルギニン塩酸塩溶液 (1 mL) を加えたのち、1 mol/L NaOHを用いてpHを約7.5に調整した。

## 3) 細胞融合

抗体価の上昇が認められたマウスに、対応する免疫原 (50  $\mu$ g) の生理食塩水溶液 (0.5 mL) を腹腔内投与した。その3日後に脾臓を摘出して基本培地 (10 mL) を入れたシャーレ中で脾リンパ球をほぐし、細胞浮遊液を調製した。ステンレスメッシュを用いて組織片を除去したのち、室温で遠心 (1600 rpm、6分) し、上清を除去。ペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁させて、同条件で遠心し、上清を除去。この操作を更に1回行ったのちペレットに基本培地 (10 mL) を加えて細胞を懸濁し、その一部を用いて細胞数を計算した。上記の脾細胞浮遊液 (全量) 及びその約1/5数のミエローマ細胞を遠心管に移して室温で遠心 (1600 rpm、5分) し、上清を十分に除去したのち、ペレットに予め37°Cに加熱しておいたPEG溶液 (1 mL) を1分を要して滴下した。本細胞懸濁液を1分間静かに混合したのち基本培地を3回に分けて添加し (1 mLを1分; 1 mLを1分; 8 mLを3分)、同条件で遠心。上清を除去したのちペレットをよくほぐし、10% HCFを含むHAT培地 (用いた脾細胞1 x 10<sup>6</sup> 個あたり50 mL) を加えて融合操作後の細胞を懸濁させた。これを、96ウェルクラスターディッシュに分注 (100  $\mu$  L/well) し、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。翌日、HAT培地 (100  $\mu$  L/well) を添加し、3日目、6日目に培地の約半量を吸引除去し、HAT培地 (100  $\mu$  L/well) を新たに加えた。

## 【0019】4) 培養上清中の抗ダイオキシン抗体のスクリーニング

培養開始より8~10日後にハイブリドーマの培養上清の一部を採取し、0.1% BSA を含む PBS と混合して上述の第二抗体固定化 ELISA プレートに添加した。室温で1時間インキュベーションしたのち、溶液を吸引除去し、プレートをPBSで3回洗浄した。HRP標識ダイオキシン (0.1  $\mu$ g; 100  $\mu$  L) を加えて同条件でインキュベーションしたのち、同様にプレートを洗浄した。各ウエ

ルに基質溶液 (100  $\mu$  L/well) を添加し、上記の方法でプレート上の HRP 活性を測定した。ダイオキシンに対する抗体を産生しているハイブリドーマの中から、TMDD (50pg/well) により抗体-HRP標識ダイオキシンの結合を阻害されたハイブリドーマを選んだ。更にその中で (1) 2, 3, 7, 8-TCDD及び (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDDでの阻害効果の大きい抗体を産生しているハイブリドーマをスクリーニングし、(1) に対する親和性の強いモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、D2-37、D9-36及びD35-42を得た。

## 5) クローニング法

スクリーニングにより選択した各ハイブリドーマについて、限界希釈法によりクローニングを行った。ハイブリドーマを10% HCFを含むHT培地で10ヶ/mLに希釈し、96ウェルの培養プレートの各ウエルに0.2 mLづつ分注して10日間培養した。ハイブリドーマの増殖がみられるウエルについて、顕微鏡下で単一クローンであることを確認した後、抗体産生ハイブリドーマを48ウェルの培養プレートに移植して順次増殖させ、単一クローンのハイブリドーマ、D2-37、D9-36及びD35-42を得た。

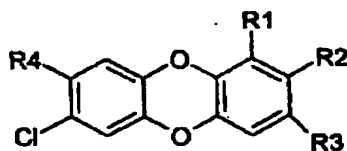
## 【0020】6) モノクローナル抗体の特徴

上記5) で得られた3種のハイブリドーマから得られた3種のモノクローナル抗体についての毒性等価係数と交差率について図1, 2, 3に示す。交差率は2, 3, 7, 8-TCDDの検量線から算出した各同族体の2, 3, 7, 8-TCDD相当量を各同族体の添加量で除して求めた。図1~3から判るように、上記3種のモノクローナル抗体は、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い

(1) 2, 3, 7, 8-TCDDに最大の親和性を有し、また同様に毒性の強い (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD、(10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF および/または (8) 2, 3, 7, 8-TCDFに親和性が高い。母乳など生体試料中のダイオキシン同族体含有比は個体差が小さく、前記3種 (1)、(2)、(10) の同族体で全TEQ (毒性当量) の大部分を占めているため、本モノクローナル抗体を用いるELISAにより生体試料中のTEQをモニタリングすることが可能である。特に、D9-36のダイオキシン同族体との交差率はTEF (toxic equivalency factor) と近似しているため、同族体含有比の異なる試料についても適用できる可能性が有る。また、D35-42はTCDD及びPeCDDのみを認識するため、各同族体含有の大きく異なる環境試料でも前記2種の同族体を測定できる可能性がある。モノクローナル抗体の交差率は表2に示す通りである。

## 【0021】

## 【表2】



ハブテン	R1	R2	R3	R4
I-1	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-2	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-3	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	H	Cl	Cl
I-4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I-5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I-6	CH=C(CH <sub>3</sub> )COOH	Cl	Cl	Cl
I-7	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-8	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-9	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I-10	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
II-1	H	OCH <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II-2	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl
II-3	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl
II-4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II-5	H	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II-6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II-6M	H	CH=CHCOOH	H	CH <sub>3</sub>
II-6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

3つのモノクローナル抗体の特徴をまとめると以下の通りである。

D2-37：2,3,7,8-TCDDに親和性が最も高く、他の同族体との交差率が低いため、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い2,3,7,8-TCDDを特異的かつ高感度で測定することができる。

D9-36：2,3,7,8-TCDDの他、1,2,3,7,8-PeCDDおよび2,3,4,7,8-PeCDFにも親和性が高いため、母乳など生体試料中のダイオキシン毒性等価量をモニターすることができる。また、他の同族体との交差率もTEFと良く相関するため、環境試料などの毒性評価にも使用できる。

D35-42：2,3,7,8-TCDDおよび1,2,3,7,8-PeCDDと特異的に反応するため、簡単な前処理を行うだけであらゆる試料中の前記2種ダイオキシン同族体を測定することができる。

【0022】II. 2,3,7,8-TCDDの標準曲線

第二抗体固定化プレートに0.1%ゼラチンを含むPBSで希

釈したマウス腹水 (D2-37：200,000倍、D9-36：1,000,000倍、D35-42：400,000倍) と I-5-HRP (0.4 μg/mL) の混液 90 μL 及び 2,3,7,8-TCDDの0.05%トリトンX-100溶液 (0.4, 2, 10, 50, 250, 1250 pg/10 μL) 10 μLを各ウェルに加えて4℃で一晩放置した。以下、前記と同様に操作して吸光度を測定した。図4に示した通り、本ELISAによる2,3,7,8-TCDDの測定限界は1 pg前後であり、公知の方法に比較して100倍前後の感度の向上がみられた。

【0023】公知のモノクローナル抗体との比較

前述の特開昭63-14691号公報 (USP4, 798, 807号) に記載されたダイオキシン類に対するモノクローナル抗体DD-1、DD-3、DD-4、DD-5、DD-6との、ダイオキシン類との交差率及びアイソタイプに関し比較したものを表3に示す。

【表3】

19			20							
ハイブリドーマ	アイソタイプ		交差率(2,3,7,8-TCDDを1とした場合)							
	クラス	L鎖	(1)	(2)	(3)	(7)	(8)	(10)	(17)	
引例	DD-1	IgG1	κ	1.00	6.25	0.10	< 0.01	2.60	0.40	< 0.01
	DD-3	IgG1	κ	1.00	3.13	0.13	< 0.01	3.57	8.33	< 0.01
	DD-4	IgG2a	κ	1.00	20.71	0.03	< 0.01	0.45	5.80	< 0.01
	DD-5	IgG2a	κ	1.00	3.00	< 0.09	< 0.05	10.00	6.00	< 0.05
	DD-6	IgG2a	κ	1.00	1.43	< 0.05	< 0.03	20.00	1.67	< 0.03
	D2-37	IgG2a	κ	1.00	0.19	0.10	0.03	0.26	0.29	0.02
本発明	D9-36	IgG1	κ	1.00	0.48	0.06	0.002	0.23	0.45	0.008
	D35-42	IgG2a	κ	1.00	0.96	< 0.005	0.000	< 0.005	< 0.005	0.0001

(1) : 2,3,7,8-TCDD

(2) : 2,3,4,7,8-PeCDD

(3) : 1,2,3,4,7,8-HxCDD

(7) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDD

(8) : 2,3,7,8-TCDF

(10) : 2,3,4,7,8-PeCDF

(17) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDF

表3から判るように、

(i) 本発明の抗体は、公知の引例のものに比較して

(2) (8) (10) との交差率が異なり、新規なモノクローナル抗体である。

(ii) 本発明の抗体は、公知の引例のものと類似化合物との交差率が異なるので、毒性評価において、測定値と毒性当量との相関性が異なる。

(iii) 本発明の3種のモノクローナル抗体は、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い(1) 2, 3, 7, 8-TCDDに最大の親和性を有し、また同様に毒性の強い

(2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD、(10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDFおよび/または(8) 2,

3, 7, 8-TCDFに親和性が高い。母乳など生体試料中のダイオキシン同族体含有比は個体差が小さく、前記3種(1)、(2)、(10)の同族体で全TEQ

(毒性当量)の大部分を占めているため、本モノクローナル抗体を用いるELISAにより生体試料中のTEQをモニタリングすることが可能である。特に、D9-36のダイオキシン同族体との交差率はTEF(toxic equivalency factor)と近似しているため、同族体含有比の異なる試料についても適用できる可能性が有る。また、D35-42はTCDD及びPeCDDのみを認識するため、各同族体含有の大きく異なる環境試料でも前記2種の同族体を測定できる可能性がある。先にも述べたが、本発明の3つのモノクローナル抗体は以下のような特徴を有する。

D2-37: 2, 3, 7, 8-TCDDに親和性が最も高く、他の同族体との交差率が低いため、ダイオキシン類の中で最も毒性の強い2, 3, 7, 8-TCDDを特異的かつ高感度で測定することができる。

D9-36: 2, 3, 7, 8-TCDDの他、1, 2, 3, 7, 8-PeCDDおよび2, 3, 4, 7, 8-PeCDFにも親和性が高いため、母乳など生体試料中のダイオキシン毒性等価量をモニターすることがで

きる。また、他の同族体との交差率もTEFと良く相関するため、環境試料などの毒性評価にも使用できる。

D35-42: 2, 3, 7, 8-TCDDおよび1, 2, 3, 7, 8-PeCDDと特異的に反応するため、簡単な前処理を行うだけであらゆる試料中の前記2種ダイオキシン同族体を測定することができる。

#### 【0024】

【発明の効果】本発明のモノクローナル抗体類は、試料中に含有されているダイオキシン類の同定のために用いることができ、試料中のダイオキシン類の濃度測定に用いることができる。対象試料としては、土壌、水、飛灰、大気及び動植物の組織、ヒト血液や母乳等の生体試料等を挙げることができる。本発明のモノクローナル抗体はダイオキシン類中、とりわけ毒性の強い、2, 3, 7, 8-TCDDと1, 2, 3, 7, 8-PeCDDをターゲットの両同族体にはほぼ等しい親和性を示す、いわゆる群特異的なモノクローナル抗体であり、ダイオキシン汚染の高感度な一次簡易スクリーニング法及び毒性のモニタリング法として有用である。本発明のモノクローナル抗体は一定品質のものを大量かつ半永久的に供給することが可能なため、イムノアッセイの確立ばかりか、分析試料の簡易クリーンアップ法としてのイムノアフィニティー抽出法の開発にも極めて有用である。又本発明では上記モノクローナル抗体を用いてELISA法を確立し、標準溶液の測定域は1~1000pgであることから、極微量のダイオキシンを定量することが出来、母乳中のダイオキシンのTEQ換算曝露レベル評価に十分、実用性が高いものである。

#### 【0025】

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】ハイブリドーマD2-37から得られたモノクローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフである。

【図2】ハイブリドーマD9-36から得られたモノク

ローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフである。

【図3】ハイブリドーマD35-42から得られたモノクローナル抗体の毒性等価係数と交差率を示すグラフで\*

【図1】

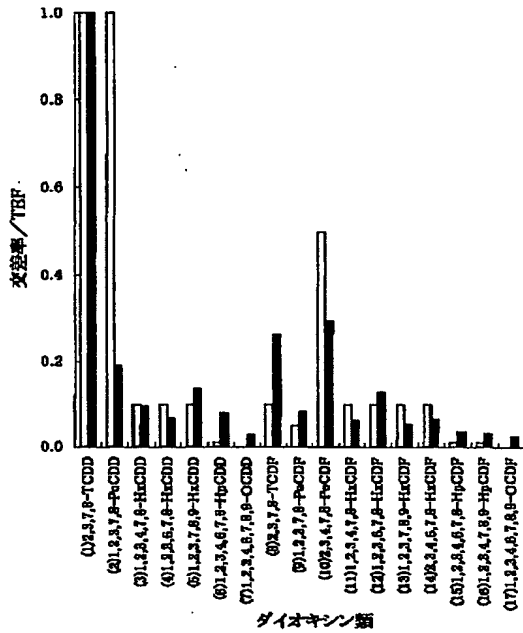


図1 D2-37の交差率(■)とTEF(□)

\*ある。

【図4】本発明のモノクローナル抗体を用いたELISA法によるダイオキシン(2,3,7,8,-TCDD)の測定感度と範囲を示すグラフである。

【図2】

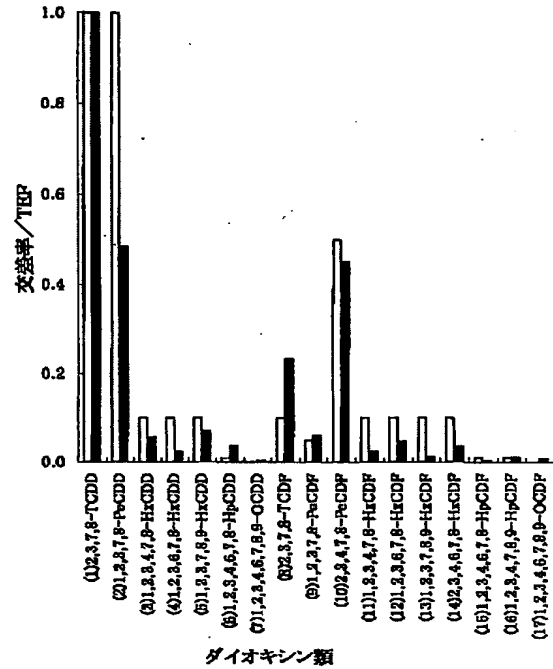


図2 D9-36の交差率(■)とTEF(□)

【図3】

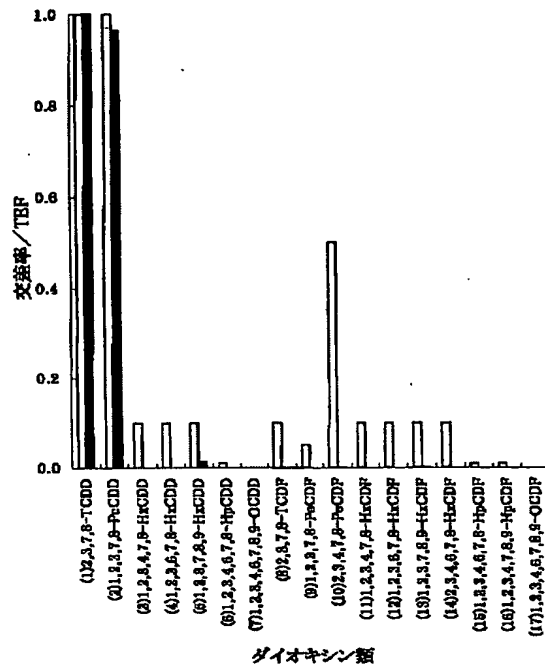
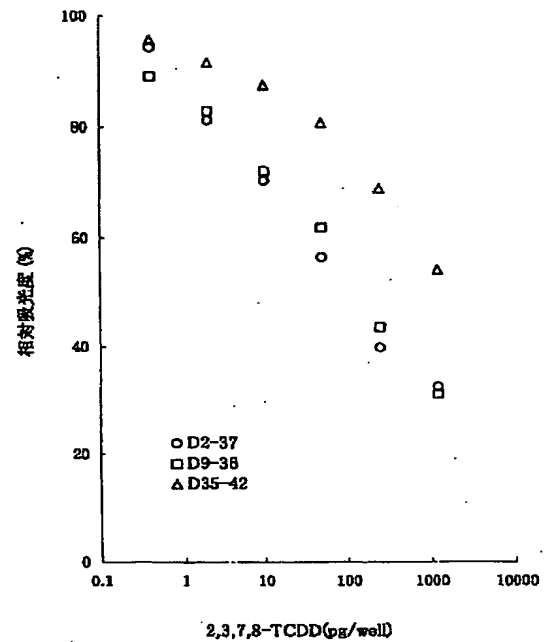


図3 D35-42の交差率(■)とTEF(□)

【図4】



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7		識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 N	9/38		G 0 1 N 33/53	G
C 1 2 P	21/08		33/543	5 4 5 A
G 0 1 N	33/53		33/577	B
		33/543		
		33/577		
// (C 1 2 N	5/10		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R	1:91)		(C 1 2 P 21/08	
(C 1 2 P	21/08		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R	1:91)		C 1 2 N 15/00	C
			5/00	B
			C 1 2 R 1:91)	
(72) 発明者 佐藤雅之			F ターム (参考)	4B024 AA11 AA17 BA08 BA11 BA53
静岡県静岡市谷田52-1 静岡県立大学・				DA02 FA10 GA05 HA15
薬学部内				4B050 CC02 DD02 DD09 LL03
(72) 発明者 後藤順一				4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 東北大学				DA16
大学院・薬学研究科内				4B065 AA92X AB05 AC10 CA25
(72) 発明者 奥山 光伸				CA46 CA54
神奈川県秦野市落合729-5 財団法人食				4H045 AA11 AA20 AA30 BA30 BA51
品薬品安全センター 秦野研究所内				CA42 DA75 EA50 FA72

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-119279

(43)Date of publication of application : 23.04.2002

---

(51)Int.Cl. C12N 15/02  
C07D319/24  
C07K 16/44  
C12N 5/10  
C12N 9/08  
C12N 9/38  
C12P 21/08  
G01N 33/53  
G01N 33/543  
G01N 33/577  
// (C12N 5/10  
C12R 1:91 )  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

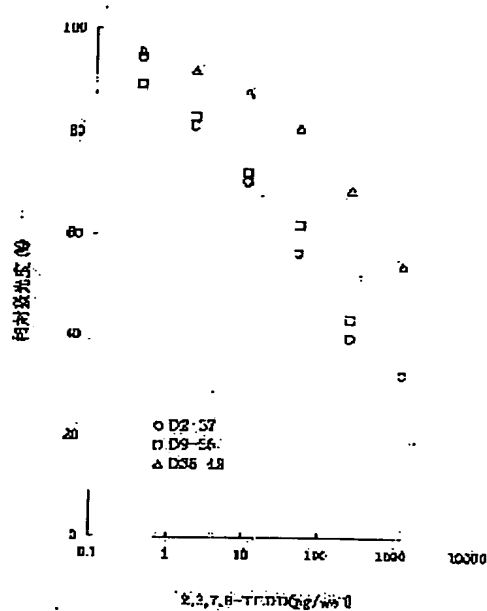
---

(21)Application number : 2000-315948 (71)Applicant : FOOD & DRUG SAFETY  
CENTER

(22)Date of filing : 16.10.2000 (72)Inventor : MATSUKI YASUHIKO  
KOBEGAWA AKIRA  
SATO MASAYUKI  
GOTO JUNICHI  
OKUYAMA MITSUNOBU

---

(54) MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST DIOXIN AND ITS USE



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線

#### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To establish a simple and high-sensitivity enzyme immunoassay

method for dioxins in a human biological sample.

**SOLUTION:** Dioxins in a human biological sample are detected and assayed by an enzyme

immunoassay method by a monoclonal antibody

which is specific to one or more dioxins and has

the maximum affinity for 2,3,7,8-

tetrachlorodibenzo-p-dioxin among dioxins.

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

**CLAIMS**

[Claim(s)]

[Claim 1] The monoclonal antibody whose compatibility it is a more specific monoclonal antibody than 1 or it of dioxin, and is max among dioxin at 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin.

[Claim 2] The monoclonal antibody according to claim 1 whose dioxin is Polyhalogenation dibenzo-p-dioxin or a Polyhalogenation dibenzofuran.

[Claim 3] The monoclonal antibody according to claim 1 or 2 whose dioxin is the Polyhalogenation-p-dioxin of following the (1) - (7), or the Polyhalogenation dibenzofuran of following the (8) - (17).

(1) 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (2378TCDD), (2) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzo-p-dioxin (12378PeCDD), (3) 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123478HxCDD), (4) 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123678HxCDD), (5) 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123789HxCDD), (6) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachloro dibenzo-p-dioxin (1234678HpCDD), (7) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-octachloro dibenzo-p-dioxin (12346789OCDD), (8) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (2378TCDF), (9) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzofuran (12378PeCDF), (10) 2, 3, 4, 7, 8-pentachloro dibenzofuran (23478PeCDF), (11) 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (123478HxCDF), (12) 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (123678HxCDF), (13) 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexachloro dibenzofuran (123789HxCDF), (14) 2, 3, 4, 6, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (234678HxCDF), (15) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachloro dibenzofuran (1234678HpCDF), (16) 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-heptachloro dibenzofuran (1234789HpCDF), (17) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-octachloro dibenzofuran (12346789OCDF).

[Claim 4] Furthermore, the monoclonal antibody according to claim 3 whose compatibility of (2), (8), or (10) is size.

[Claim 5] The monoclonal antibody according to claim 4 whose rate of a crossover of (2) and (10) is before and after 0.5 when compatibility of (1) is set to 1.0.

[Claim 6] The monoclonal antibody according to claim 4 0.2 order and whose rate of a



crossover of (8) and (10) are before and after 0.3 for the rate of a crossover of (2) when compatibility of (1) is set to 1.0.

[Claim 7] The monoclonal antibody according to claim 4 whose rate of a crossover of (2) is before and after 1.0 when compatibility of (1) is set to 1.0.

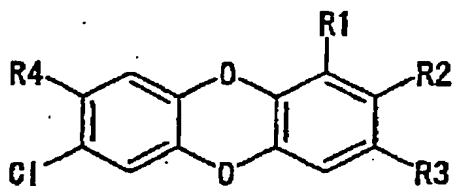
[Claim 8] The monoclonal antibody according to claim 5 which is what is produced from a hybridoma D 9-36 (FERM P-18057).

[Claim 9] The monoclonal antibody according to claim 6 which is what is produced from a hybridoma D 2-37 (FERM P-18056).

[Claim 10] The monoclonal antibody according to claim 7 which is what is produced from a hybridoma D 35-42 (FERM P-18058).

[Claim 11] Carry out immunity of the animal with the connective of the hapten and the protein which are expressed with the following formulas, and an antibody manufacture cell is obtained from this animal. Unite said cell with a tumor cell and two or more hybridomas (mixed kind) are made to generate. The manufacture approach of a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 which chooses at least one sort of hybridomas which manufacture dioxin and the antibody which reacts from these two or more hybridomas, and is characterized by collecting the antibodies manufactured from this hybridoma.

[Formula 1]



R1 among a formula  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ,  $\text{NHCOCH}=\text{CHCOOH}$ ,  $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , It is the functional group chosen from  $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ ,  $2(\text{CH}=\text{CH})\text{COOH}$ , and H. R2 is a functional group chosen from H, Cl,  $\text{OCH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ,  $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , and  $2(\text{CH}=\text{CH})\text{COOH}$ , R3 is Cl or H, and R4 is Cl,  $\text{CH}_3$ , or  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ .

[Claim 12] The manufacture approach of a monoclonal antibody according to claim 11 that the proteins in the hapten-protein connective used by claim 11 are bovine serum albumin, ovalbumin, and a SUKASHI shellfish hemocyanin.

[Claim 13] The manufacture approach of a monoclonal antibody according to claim 11 that a hybridoma is D 9-36 (FERM P-18057), D 2-37 (FERM P-18056), or D 35-42 (FERM P-18058).

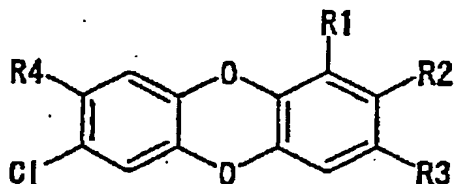
[Claim 14] The hybridoma which is obtained in claim 11 and which produces a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7.

[Claim 15] The hybridoma according to claim 14 which is D 9-36 (FERM P-18057), D 2-37 (FERM P-18056), or D 35-42 (FERM P-18058).

[Claim 16] Detection of the dioxin by the immunity enzyme measuring method using a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10, a measuring method.

[Claim 17] Enzyme-labeling hapten which combined the hapten expressed with the following formulas, and an enzyme and which is used for the assay system of dioxin.

[Formula 2]



R1 among a formula  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $\text{NHCO}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ,  $\text{NHCOCH}=\text{CHCOOH}$ ,  $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , It is the functional group chosen from  $\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOH}$ ,  $2(\text{CH}=\text{CH})\text{COOH}$ , and H. R2 is a functional group chosen from H, Cl,  $\text{OCH}_2\text{COOH}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ ,  $\text{CH}=\text{CHCOOH}$ , and  $2(\text{CH}=\text{CH})\text{COOH}$ , R3 is Cl or H, and R4 is Cl,  $\text{CH}_3$ , or  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ .

[Claim 18] Enzyme-labeling hapten according to claim 17 whose enzymes are horseradish peroxidase and the beta-galactosidase.

[Claim 19] 1) and (1) -- the solid phase which fixed the antibody to a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 -- (2) A monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10, Enzyme-labeling hapten according to claim 17 is made to react. (3) -- the sample containing dioxin, and (4) -- 2) Detection of the dioxin according to claim 16 characterized by measuring the concentration of the dioxin in a sample by measuring the marker enzyme activity fixed by solid phase, measuring method.

[Claim 20] 1) and (1) -- the solid phase which fixed the monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 -- Enzyme-labeling hapten according to claim 17 is made to react. (2) -- the sample containing dioxin, and (3) -- 2) Detection of the dioxin according to claim 16 characterized by measuring the concentration of the dioxin in a sample by measuring the marker enzyme activity fixed by solid phase, measuring method.

[Claim 21] The constituent which is a constituent used for high grade-ization of dioxin and comes to contain a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10.

[Claim 22] Biochemical, immunological, functional, or the constituent that is a constituent used with other research analysis methods, and comes to contain the monoclonal antibody of an effective dose according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 of

dioxin.

[Claim 23] The kit which is existence of the dioxin in a sample, or a kit for measurement of concentration, and contains a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 and enzyme-labeling hapten according to claim 17.

[Claim 24] Existence of the dioxin in the sample containing the antibody to a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10, a monoclonal antibody according to claim 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10, and enzyme-labeling hapten according to claim 17, or the kit for measurement of concentration.

---

[Translation done.]

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin among the monoclonal antibody to dioxin, especially dioxin at the monoclonal antibody whose compatibility is max. This invention relates to the manufacturing method of this monoclonal antibody, detection of the dioxin which uses this monoclonal antibody, a measuring method, and the kit for it again.

[0002]

[Description of the Prior Art]

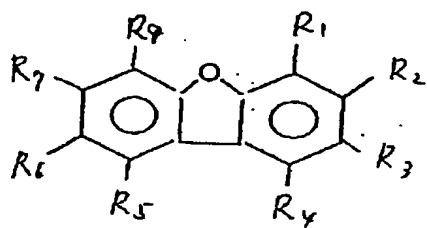
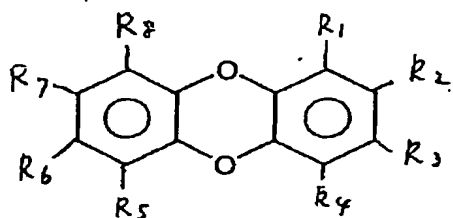
In recent years, due to concern of effect for the environmental pollution by the chemical, and those Homo sapiens health, about the dioxin contained in atmospheric air, incinerated ash, exhaust gas, wastewater, common water, food, etc., also not only in Japan but in every country in the world, it is social concerns, and the lasting toxic threat which the dioxin as an environmental pollutant does to a living thing and human beings is said. Although dioxin is the un-meaning-chemicals generated by the processing process accompanied by the heat of trash, the process of production of an organochlorine compound, etc., since a generation source is various and the environmental pollution has posed a big problem, it is pressing need to investigate exposure in Homo sapiens, and the ecosystem and the contamination situation of food by these. The developmental toxicity of dioxin has the big problem of the effect being irreversible in many cases, and moreover attaining to the next generation the top where susceptibility is high, compared with a living body's toxicity. Since the effect on the child by the mother under pregnancy and breast-feeding being exposed especially may appear also by very low-concentration dioxin, it is anxious for establishment of the microestimation which can act as the

monitor of the amount of exposures exactly and quickly. In order to measure specific dioxin with high sensitivity and high degree of accuracy about the sample in which the pollutant of varieties is intermingled, a high-resolution gas chromatography / mass spectrometry (HRGS/HRMS) has been used conventionally. However, in order to measure by HRGS/HRMS, since the proficient researcher needs to work [ long duration ] in the laboratory which other phases took complicated clean-up actuation to, and was improved well using expensive equipment in every sample, the costs are expensive remarkable things. From now on, development of a cheap, simple, and high sensitivity measuring method will be strongly desired from it being predicted that the measuring object sample kind and number of dioxin increase increasingly. Immunoassay is in one of the approaches of replacing with this HRGS/HRMS. Although some measurement of the dioxin by this approach is reported the sample (an environmental sample and standard solution) containing high-concentration dioxin -- it is (Kennel, S.J. et al. --) Toxicol.Appl.Pharmacol.1986, 82,256-263; Stanker, L.H. et al., Toxicology.1987, 45,229-243; Vanderlaan, M. et al., Toxicol.Chem.1988, 7,859-870; Sugawara, Y. et al., Anal.Chem.1998, 70, 1092-1099; Sanborn, J.R. et al., J. Agric.FoodChem.1988, 46, 2407-2416; Harrison, R.O. et al., Organohalogen Compounds 1999, 36,129-132; Zennegg, M. et al., About a biological material with low dioxin contents, such as Homo sapiens mother's milk, blood, etc. with which Organohalogen Compounds 1999, 36,317-319, and measurement are called for, there is almost no report.

[0003]

Although dioxin will point out the polychlorinated dibenzofuran (PCDFs) shown in the dioxin [Polychlorination dibenzo-p-dioxin (PCDDs)] shown in the following formulas (a), and a formula (b) if dioxin is explained further These are tricyclic chlorination compounds, and many structural isomers exist by the number of permutation chlorine, or the difference in a location, and respectively, a biological operation and a physicochemical quality have a similar thing and a completely different thing, and also change toxicity remarkably with each isomer. Thus, since toxicity differs greatly between an isomer or a homolog, it is difficult to evaluate toxicity by observation concentration.

[Formula 3]



$R_1 \sim R_8$  : HまたはCl

但し全てがHである場合を除く。

[0004]

Although there are 75 sorts of Polychlorination dibenzo-p-dioxin (PCDDs) and 135 sorts of polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in the structural isomer of dioxin. The relative toxicity when setting the toxicity over 2, 3, 7 with the strongest toxicity, and 8-TCDD to 1, since the toxicity between each isomer is greatly different, A toxic equivalence multiplier (Toxic Equivalency Factor;TEF) is advocated and let seven sorts of strong toxic PCDDs(es), and ten sorts of PCDFs(es) be the measuring objects. Moreover, four sorts of non alt.PCBs and eight sorts of mono-alt.PCBs have come to be measured as a compound in which the same living thing operation as dioxin is shown among the polychlorinated biphenyl (PCBs) known as a contaminant in an environment for some time. So, total of the value which multiplied the observation concentration of each isomer by TEF is converted into a 2, 3, 7, 8-TCDD toxicity equivalent (Toxic Equivalent quantity;TEQ), and toxic evaluation is carried out to evaluation of dioxin using this value.

[0005]

Very recently it becomes clear for the great portion of TEQ of the dioxin in mother's milk to be occupied by three sorts of (1) 2, 3, 7, 8-TCDD, (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD and (10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF. it was shown that the toxicity of dioxin can be evaluated by enzyme immunoassay (ELISA) which uses an antibody with high compatibility for these (Nakazawa, H. et al. --) Organohalogen Compounds 2000, 45, 86-89; Saito, K. et al., Organohalogen Compounds 2000, 45, 168-171; Sugawara, Y. et al., Organohalogen Compounds 2000, 45, 172-175. However, since the antibody used here was a polyclonal

antibody of a rabbit, it is impossible for supplying an antibody without the lot difference at the time of production or acquisition in large quantities, and the problem was in the stability of the measuring method and a measurement result, and universality. Moreover, since two or more antibody kinds (clonotype) which participate in a reaction are intermingled even if it uses the antiserum of the same lot, the antibody kinds which react depending on a test portion may differ, and measured value may be changed. The measuring method of dioxin using the monoclonal antibody and it to dioxin is also proposed that the fault of the approach using the above-mentioned polyclonal antibody should be improved [refer to JP,63-14691,A (USP No. 4,798,807) and JP,63-74494,A]. These monoclonal antibodies have the indefinite information about the singularity and anti-dioxin antibody titer to dioxin. However, as a measuring method A thing given in JP,63-74494,A Since cross-reactivity with other dioxin homologs is not shown, from a toxic viewpoint, cannot evaluate the measurement result searched for using this antibody, and The toxicity of the thing of JP,63-14691,A is the strongest. From 2, 3, 7, 8-TCDD, to other dioxin homologs Since compatibility is high, There is a fault of not correlating with a toxic equivalent the measured value of the real sample from which the mixing ratio of a homolog differs, and also It was the thing which cannot be used for the quantum of the real sample in which the limit of determination of 2, 3, 7, 8-TCDD is before and after 1ng, and both contain the dioxin of minute amounts, such as a biological material, and which there is a problem by \*\* and lacks in practicality.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

The enzyme immunoassay method [ high sensitivity simply / this invention / the dioxin in a human biological material / and ] (ELISA) is established, and let it be a technical problem to offer the monoclonal antibody which was suitable for the purpose of offering the approach of \*(ing) to the monitoring and situation investigation of contamination especially by the dioxin in Homo sapiens.

[0007]

[Means for Solving the Problem]

Nakazawa and others investigated about the functionality of each measurement result of the homolog of the dioxin in the Homo sapiens mother's milk which might be measured by HRGC/MS, and the toxic equivalent (TEQ) computed based on the toxic equivalence multiplier (TEF) in order to check about selection and felicity of the measuring object by the ELISA method. Consequently, especially two sorts, (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, and (10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF, especially were excellent in correlation with TEQ, and when three sorts including 2, 3, 7 with high TEF, and 8-TCDD could be measured by ELISA, it was checked that dioxin exposure evaluation by the Homo sapiens as a toxic equivalent reduced property can be performed. As a result of repeating research in order to obtain a specific

monoclonal antibody to the three above-mentioned sorts, this invention persons succeed in obtaining the new monoclonal antibody which has the maximum compatibility in 8-TCDD among [ 2, 3, and 7 ] dioxin, and reach this invention.

[0008]

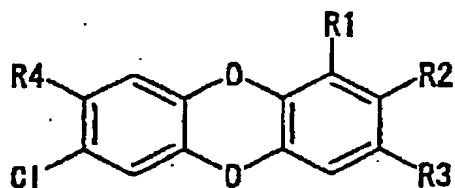
That is, this invention is a more specific monoclonal antibody than 1 or it of dioxin, and relates to 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin among dioxin at the monoclonal antibody whose compatibility is max. In this invention, dioxin points out Polyhalogenation dibenzo-p-dioxin or a Polyhalogenation dibenzofuran, and the Polyhalogenation-p-dioxin of following the (1) - (7) or the Polyhalogenation dibenzofuran of following the (8) - (17) is raised as these examples.

(1) 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin (2378TCDD), (2) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzo-p-dioxin (12378PeCDD), (3) 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123478HxCDD), (4) 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123678HxCDD), (5) 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexachloro dibenzo-p-dioxin (123789HxCDD), (6) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachloro dibenzo-p-dioxin (1234678HpCDD), (7) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-octachloro dibenzo-p-dioxin (12346789OCDD), (8) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran (2378TCDF), (9) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzofuran (12378PeCDF), (10) 2, 3, 4, 7, 8-pentachloro dibenzofuran (23478PeCDF), (11) 1, 2, 3, 4, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (123478HxCDF), (12) 1, 2, 3, 6, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (123678HxCDF), (13) 1, 2, 3, 7, 8, 9-hexachloro dibenzofuran (123789HxCDF), (14) 2, 3, 4, 6, 7, 8-hexachloro dibenzofuran (234678HxCDF), (15) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachloro dibenzofuran (1234678HpCDF), (16) 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-heptachloro dibenzofuran (1234789HpCDF), (17) 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-octachloro dibenzofuran (12346789OCDF). This invention offers the monoclonal antibody which has the maximum (1) 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin, and has a compatibility with (2) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzo-p-dioxin, (8) 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzofuran and/or (10) 2, 3, 4, 7, 8-pentachloro dibenzofuran. This invention offers the monoclonal antibody produced again from a hybridoma D 9-36 (FERM P-18057), a hybridoma D 2-37 (FERM P-18056), or a hybridoma D 35-42 (FERM P-18058).

[0009]

This invention carries out immunity of the animal again with the connective of the hapten and the protein which are expressed with the following formulas. Obtain an antibody manufacture cell from this animal, unite said cell with a tumor cell, and two or more hybridomas are made to generate. At least one sort of hybridomas which manufacture dioxin and the antibody which reacts are chosen from these two or more hybridomas, and it is related with the manufacture approach of a monoclonal antibody characterized by collecting the antibodies manufactured from this hybridoma.

[Formula 4]



R<sub>1</sub> among a formula NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH, NHCO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH, NHCOCH=CHCOOH, CH=CHCOOH, It is the functional group chosen from CH=C(CH<sub>3</sub>)COOH, 2(CH=CH)COOH, and H. R<sub>2</sub> is a functional group chosen from H, Cl, OCH<sub>2</sub>COOH, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>COOH, O(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH, CH=CHCOOH, and 2(CH=CH)COOH, R<sub>3</sub> is Cl or H, and R<sub>4</sub> is Cl, CH<sub>3</sub>, or C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. As protein combined with the above-mentioned hapten, bovine serum albumin, ovalbumin, a SUKASHI shellfish hemocyanin, etc. are mentioned. Moreover, this invention relates to the hybridoma expressed especially with D 9-36 (FERM P-18057), D 2-37 (FERM P-18056), or D 35-42 (FERM P-18058) about the hybridoma which produces the above-mentioned monoclonal antibody. Furthermore, this invention is biochemical, immunological, functional, or the thing about the constituent used with other research analysis methods containing the monoclonal antibody of detection of the dioxin by the immunity enzyme measuring method which uses the monoclonal antibody of this invention, a measuring method, the high grade-ized constituent of the dioxin containing the monoclonal antibody of this invention, and this invention of dioxin. Moreover, it is related with existence of the monoclonal antibody of this invention and the dioxin in the sample containing enzyme-labeling hapten, or the kit for measurement of concentration. The monoclonal antibodies of this invention can be used for identification of the dioxin contained in the sample, and it can be used for the density measurement of the dioxin in a sample. As an object sample, biological materials, such as environmental samples, such as soil, water, atmospheric air, and fly ash, and blood, and mother's milk, etc. can be mentioned.

[0010]

When it uses as a reagent in the various immunity analysis methods for measuring existence of dioxin or concentration, an analysis method improves by use of the monoclonal antibodies of this invention. Singularity becomes high while becoming more conveniently and quickly [ detection ], and sharp. As an immunity analysis method which can use the monoclonal antibodies of this invention, although radioimmunoassay (RIA) (radioimmunity analysis), contention immunity precipitate analysis, enzyme connection immune absorbance analysis (ELISA), and immunofluorescence analysis can be mentioned, it is not limited only to these immunity analysis methods. Especially in this invention, using for an immunity enzyme measuring method is desirable, in that case, a false antigen is fixed and the indirect competing method make a reaction with the dioxin



in a sample and a monoclonal antibody compete, and the direct competing method for fixing an antibody and seeing a reaction rate with the dioxin in a sample and enzyme-labeling hapten are mentioned. Although the monoclonal antibody of this invention can also be used as an antibody in the latter, the second antibody to Mouse IgG is fixed, and the methods of making a sample, a monoclonal antibody, and enzyme-labeling hapten contact are points, such as the repeatability, simple nature, and sensibility, and it excels, and is desirable. Horseradish peroxidase, the beta-galactosidase, etc. are mentioned as an enzyme for carrying out the indicator of the hapten.

[0011]

The constituent by this invention which authorizes thru/or measures the existence of dioxin or concentration in a sample contains the antibody of effective concentration, in order to carry out the antibody of concentration effective in order to detect existence of a chemical, or the quantum of the amount of chemicals. Mixing or an antibody may be made for the suitable support and the suitable antibody like a latex particle or a plastics microtiter plate to adhere to such support. According to the immunologic procedure to be used, an enzyme or coloring matter can also be blended with an antibody, and radiolabeling can also be attached. Therefore, all the analysis methods using the dioxin containing 2, 3, 7, 8-TCDD and the monoclonal antibodies which react are included by the technical range of this invention. Based on an alternative immunoreaction, from complicated mixture or a solution, the monoclonal antibodies of this invention can use dioxin measurement, isolation, purification, and/or in order to remove. By use of dioxin and the monoclonal antibody which reacts, a conventional method is improved remarkably. The properties that use these monoclonal antibodies for the above-mentioned reaction, and usefulness is demonstrated are the remarkable singularity accepted in comparison with polyclonal antibodies, and the large-scale industrial thing which it is, and it carries out, and use of the homogeneous antibody in a commercial scale is enabled, and can come to hand without a limit quantitatively in practice.

[0012]

For example, using the monoclonal antibody of this invention, 2, 3, 7, 8-TCDD can be separated from the mixture of other dioxin or similar organic compounds, and it can purify. If mixture is contacted to the monoclonal antibody of fixed this invention, the fixed complex of 2, 3, 7, 8-TCDD which the antibody combined is formed, after it dissociates from mixture and 2, 3, 7, 8-TCDD removes mixture, 2, 3, 7, 8-TCDD will be separated from an antibody, and a well-known technique will recover the thing of a high grade. or [ fixing the constituent by this invention used in order to purify thru/or collect dioxin from complicated mixture on a permissible equipment ] -- or it is made to mix with permissible support and the monoclonal antibody of this invention of the effective dose

of the condition in which a reaction and association with dioxin are possible is contained. The monoclonal antibodies of this invention are also the useful reagents for the research related to the structure and the operation function of dioxin. It becomes possible to use it for the immunochemical analysis of dioxin, and structure activity analysis for the sharp singularity which the antibodies of this invention have, and becomes what was suitable for singularity with the application like the above as compared with the polyclonal antibodies of a scarce conventional method. The constituent by this invention used as a research reagent contains the antibody of the amount which demonstrates the effectiveness of offering information by analysis following mixing with dioxin, and it. About the amount, it can decide suitably.

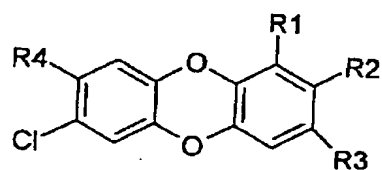
[0013]

It is as follows when production of the new monoclonal antibody of this invention and construction of the ELISA method are described in more detail.

1) Synthesis of a hapten antigen, a protein binding object, and an indicator object

About ten sorts of hapten antigens shown in Table 1 were synthesized in which a spacer having a different length and having a terminal carboxyl group through an acid amide, an ether, or a double bond is introduced at C-1 or C-2 of the dioxin frame.

[Table 1]



ハプテン	R1	R2	R3	R4
I - 1	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 2	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 3	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I - 5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I - 6	CH=C(CH <sub>3</sub> )COOH	Cl	Cl	Cl
I - 7	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 8	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 9	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 10	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
II - 1	H	OCH <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II - 2	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl
II - 3	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl
II - 4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II - 5	H	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II - 6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II - 6M	H	CH=CHCOOH	H	CH <sub>3</sub>
II - 6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

Chose several sorts of haptens from these, on the other hand, the connective which it is with bovine serum albumin (BSA) was made to react with a Western peroxidase (HRP) by the activity ester method again, and several sorts of enzyme-labeling objects were acquired.

[0014]

## 2) Monoclonal antibody

Repetitive immunity administration of the BSA connective of four sorts (I-2, I-3, I-5, II-2) of haptens was carried out at BALB/c or an A/J mouse, and the inhibition effectiveness according to TMDD about the individual which gave the result with the good anti-dioxin antibody titer in a blood serum investigated the affinity of an antibody further. Subsequently, the splenic cells obtained from two BALB/c mice with which the good result was obtained, and one A/J mouse, and a P3/NSI/1-Ag4-1 myeloma cell were united using polyethylene glucol, and the culture supernatant of the syncytium obtained by HAT selective culture was screened by ELISA. Consequently, it was shown that the hybridoma around 200 sorts is secreting the anti-dioxin antibody.

3) Choose the hybridomas which produce an antibody having a greater inhibition effectiveness by TMDD and 2, 3, 7, 8-TCDD. Carry out cloning of the obtained hybridoma and a monoclonal antibody is prepared. As a result of examining many of the properties in a detail, it is a more specific monoclonal antibody than 1 or it of dioxin. It succeeded in obtaining the new monoclonal antibody whose compatibility is max among dioxin at 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin.

In the monoclonal antibody of this invention, some have a compatibility with (2) 1, 2, 3, 7, 8-pentachloro dibenzo-p-dioxin, (8) 2, 3, 7, 8-tetrachloro dibenzofuran and/or (10) 2, 3, 4, 7, 8-pentachloro dibenzofuran.

[0015]

## [Examples]

I. The various conditions which are in charge of experimenting were as following.

### 1. Materials for Experiment

#### 1) Hapten-Bovine-Serum-Albumin (BSA) Combination and Peroxidase (HRP) Indicator Hapten

Four-sort hapten (I-2, I-3, I-5, II-2) BSA combination, and eight-sort hapten (I-2, I-3, I-5, I-6, I-7, I-10, II-4, II-6) HRP indicator object as shown in Table 1 were used.

#### 2) Mouse

BALB/c and A/J mice (all are a female and 8 week-old) were purchased from Japan SLC.

#### 3) Myeloma cell strain

P3/NS1/1-Ag 4-1 Myeloma cell strain was provided by the Human Science Research Resource Bank.

[0016]

## 2. Reagent and Equipment

### 1) Immunity and ELISA Relation

Freund \*\* -- perfect and Freund's incomplete adjuvant: DIFCO 0638-60-7 and 0639-60-6 affinity purification rabbit anti-mouse IgG+IgM Antibody (second antibody): Jackson 315-005-0441, 2, and 7-3 chlorination-8-methyl dioxin (TMDD) : Wellington Laboratories o-phenylenediamine dihydrochloride: Sigma P902930% Hydrogen peroxide solution: Wako Pure Chem industry ELISA \*\* microtiter plate: Sumitomo Bakelite MS-9596F

### 2) Cell-fusion relation

RPMI 1640 powder culture medium: GIBCO-BRL 31800-022 fetal calf serum (FCS) : GIBCO-BRL 26140-079 hybridoma cloning factor (HCF) : IGENHAT Media Supplement: Sigma H0262 polyethylene glycol 4000 (PEG) : Merck Art 9727 dimethyl sulfoxide (DMSO): Sigma D2650 culture flask (25 cm<sup>2</sup>) : Iwaki Glass 3100-025 culture flask (75 cm<sup>2</sup>) : Becton Dickinson 3824 cluster dish (96 wells) : The special grade chemical was used for the salts, the organic solvent, etc. of Costar 3598 and others.

### 3. Device

ELISA plate reader (BL 312e) : Bio-Tek Instrument Inc.

### 4. immunity and the test blood collecting

Above-mentioned four-sort hapten (I-2, I-3, I-5, II-2) BSA It is each of combination by the following procedures BALB/c It carried out immunity administration each at a mouse and five A/J mice repeatedly. Hapten-BSA combination (50microg) Sterilization physiological saline (0.1 mL) It dissolves and is Freund's complete adjuvant. (0.1 mL) As an emulsion, it is foot pad (1 per one leg) of the above-mentioned mouse. And regions of back (hair clipper remove hair and they are about 20 places) It administered hypodermically. Henceforth, 6 - 8 times of boosters were performed for the immunogen of tales doses as an emulsion with Freund's incomplete adjuvant. A hematocrit tube is used [ boosters / 5-7th ] from ophthalmic veins seven days after, and it is test blood collecting. (20-40microL) It carried out. The blood serum was separated from the obtained blood with the conventional method, and reactivity with the HRP indicator dioxin was investigated by the following ELISA method.

[0017]

## 5. ELISA

### 1) Buffer solution and substrate solution

PBS:0.9% NaCl containing 0.05 mol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Buffer solution (pH 7.3)

Substrate solution: 0.05% o-Phenylenediamine-HCl and 0.01% The 50 mmol/L citric-acid-sodium acetate buffer solution containing a hydrogen peroxide (pH 5.0) .

### 2) Preparation of a second antibody fixed plate

96 hole ELISA microtiter plate -- each -- a well -- the second antibody PBS solution (2microg/mL) Distributive pouring (100microL/well) carrying out -- 4 degrees C -- overnight neglect. After carrying out suction removal of the antibody solution, a well is washed 3 times by PBS. BSA (0.5%) PBS (150microL/well) It pours distributively to a well and is left at a room temperature for 2 to 3 hours. PBS after carrying out suction removal of the solution The well was washed 3 times and the second antibody fixed plate was produced.

### 3) Approach of ELISA

Add the mouse blood serum, the hybridoma culture medium or mouse ascites, and enzyme-labeling dioxin which were diluted with PBS which contains 0.1% gelatin to the second antibody fixed plate (standard solution of dioxin is also added in inhibition trial) (100 microL/well), and it is overnight neglect at 4 degrees C. After carrying out suction removal of the solution, a well is washed 3 times by PBS and a substrate solution is added. (100microL/well) They are 30 minutes thru/or 1-hour neglect at a room temperature. 3 mol/L sulfuric acid (50microL/well) After suspending an enzyme reaction in addition, the absorbance of 490 nm was measured with the plate reader.

[0018]

## 6. Preparation of monoclonal antibodies by cell fusion

### 1) Media

Basal medium: 10 mmol/L HEPES-NaOH buffer solution (pH 7.3) and kanamycin sulfate (0.06%) are included. RPMI-1640.

Culture-medium: -- 10 % FCS and 0.05 mmol/L 2-mercaptoethanol and 2 mmol/L L-glutamine -- and -- 1 mmol/L Basal medium containing Bill Bin acid sodium.

HAT medium: 0.01 mmol/L Hypoxanthine and 16micromol/L Thymidine and 0.4micromol/L Culture culture medium containing aminopterin.

HT medium: 0.01 mmol/L Hypoxanthine and 16micromol/L Culture culture medium containing thymidine.

### 2) PEG solution

PEG (40 g) Dulbecco PBS (-) (50 mL) It dissolves and they are DMSO (10 mL) and 0.1% Polly L-arginine hydrochloride solution (1 mL) After adding, pH was adjusted to about 7.5 using 1 mol/L NaOH.

### 3) Cell fusion

Physiological saline solution (0.5 mL) of corresponding immunogen (50microg) was intraperitoneally injected to the mouse with which the rise of antibody titer was accepted. A spleen is extracted the three days after and it is a basal medium. (10 mL) The splenic lymphocyte was unfolded in the put-in petri dish, and cell suspension was prepared. It is centrifugal at the room temperature after removing an explant using a stainless steel mesh. (1600 rpm, 6 minutes) It carries out and supernatant liquid is removed. It is a basal

medium to a pellet. (10 mL) A cell is made to suspend in addition, centrifugal is carried out on these conditions, and supernatant liquid is removed. It is a basal medium to the pellet after performing this actuation once [ further ]. (10 mL) In addition, the cell was suspended and the number of cells was calculated using that part. The above-mentioned splenic-cells suspension (whole quantity) It reaches, the myeloma cell of about 1/more than 5 is moved to a centrifuging tube, and it is centrifugal at a room temperature. (1600 rpm, 5 minutes) PEG solution beforehand warmed on the pellet at 37 degrees C after carrying out and fully removing supernatant liquid (1 mL) 1 minute was required and dropped. After mixing this cell suspension calmly for 1 minute, a basal medium is added in 3 steps. (1 mL 1 minute; 1 mL 1 minute; 8 mL 3 minutes) It is these conditions and is centrifugal. HAT medium which unfolds a pellet well after removing supernatant liquid, and contains HCF 10% (the used splenic cells 1 x per 10<sup>8</sup> pieces 50 mL) The cell after fusion actuation was made to suspend in addition. About this, it is distributive pouring (100 micro L/well) to a cluster dish 96 well. It carried out and 37 degrees C was cultivated by CO<sub>2</sub> 5%. The next day, HAT medium (100microL/well) It adds, suction removal of the abbreviation moiety of a culture medium will be carried out on the 6th for the 3rd day, and it is a HAT medium. (100microL/well) It newly added.

[0019]

#### 4) Screening of the anti-dioxin antibodies in a culture supernatant

Extract a part of culture supernatant of a hybridoma eight-ten days after the culture initiation, and it is BSA 0.1%. It contains. PBS It mixes and is above-mentioned second antibody immobilization. ELISA It added on the plate. After carrying out an incubation at a room temperature for 1 hour, suction removal of the solution was carried out and the plate was washed 3 times by PBS. HRP indicator dioxin (0.1microg; 100microL) After carrying out an incubation on these conditions in addition, the plate was washed similarly. each -- a well -- substrate solution (100microL/well) adding -- the above-mentioned approach -- plate top HRP Activity was measured. The hybridoma which had association of antibody-HRP indicator dioxin checked by TMDD (50 pg/well) was chosen from the hybridomas which are producing the antibody to dioxin. Furthermore, among them, hybridomas which are producing the antibodies of large inhibition effectiveness in (1) 2, 3, 7, 8-TCDD and (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD were screened, and hybridomas which produce monoclonal antibodies with strong compatibility to (1), D 2-37, D 9-36, and D 35-42 were obtained.

#### 5) Cloning process

About each hybridoma chosen by screening, cloning was performed by limiting dilution. HT culture medium which contains HCF for a hybridoma 10% -- ten pieces./ mL -- diluting -- the culture plate of 96 wells -- each -- a well -- every [ 0.2 mL ] -- it poured distributively and cultivated for ten days. About the well as which growth of a hybridoma

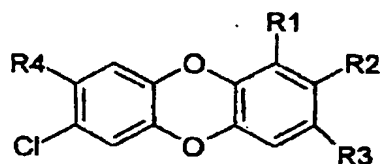
is regarded, after checking that it is a single clone under a microscope, an antibody production hybridoma is transplanted to the culture plate of 48 wells, sequential growth was carried out, and single clone hybridomas, D 2-37, D 9-36, and D 35-42 were obtained. [0020]

#### 6) Description of a monoclonal antibody

The toxic equivalence multiplier and the rate of a crossover about three sorts of monoclonal antibodies which were obtained from three sorts of hybridomas obtained by the above 5 are shown in drawing 1 , and 2 and 3. The rate of a crossover ~~\*\*~~(ed) and calculated 2, 3, 7, 2, 3, 7 of each homolog computed from the calibration curve of 8-TCDD, and a 8-TCDD considerable amount with the addition of each homolog. As shown in drawing 1 -3, the three above-mentioned sorts of monoclonal antibodies have the maximum compatibility to (1) 2, 3, 7, 8-TCDD with the strongest toxicity in dioxins, and a high compatibility to (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, (10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF and/or (8) 2, 3, 7, 8-TCDF with a strong toxicity. The dioxin homolog content ratio in biological materials, such as mother's milk, has small individual difference, and since most of all TEQ(s) (toxic equivalent) are occupied by the homolog of said three sorts (1), (2), and (10), it is possible to carry out monitoring of the TEQ in a biological material by ELISA using this monoclonal antibody. Since especially the rate of a crossover with the dioxin homolog of D 9-36 is approximated with TEF (toxic equivalency factor), it has possibility that it is applicable also about the sample from which a homolog content ratio differs. Moreover, since D 35-42 recognizes only TCDD and PeCDD, a greatly different environmental sample of each homolog content may also be able to measure said two sorts of homologs. The rate of a crossover of a monoclonal antibody is as being shown in Table 2.

[0021]

[Table 2]



ハブテン	R1	R2	R3	R4
I - 1	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 2	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 3	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	H	Cl	Cl
I - 4	NHCOCH=CHCOOH	H	Cl	Cl
I - 5	CH=CHCOOH	Cl	Cl	Cl
I - 6	CH=C(CH <sub>3</sub> )COOH	Cl	Cl	Cl
I - 7	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 8	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 9	NHCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
I - 10	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl	Cl
II - 1	H	OCH <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II - 2	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> COOH	Cl	Cl
II - 3	H	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> COOH	Cl	Cl
II - 4	H	CH=CHCOOH	Cl	Cl
II - 5	H	(CH=CH) <sub>2</sub> COOH	Cl	Cl
II - 6	H	CH=CHCOOH	H	Cl
II - 6M	H	CH=CHCOOH	H	CH <sub>3</sub>
II - 6B	H	CH=CHCOOH	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>

It is as follows when the description of three monoclonal antibodies is summarized.

D2-37: Since it has the highest compatibility to 2, 3, 7, 8-TCDD, and the rate of a crossover with other homologs is low, it can measure 2, 3, 7, 8-TCDD with the strongest toxicity in dioxins by specific and high sensitivity.

D9-36: Since it has a high compatibility to 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD and 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF besides 2, 3, 7, 8-TCDD, it can be used for monitoring of the dioxin toxicity equivalent in biological materials, such as mother's milk. Moreover, since the rate of a crossover with other homologs is also well correlated with TEF, it can be used also for toxic evaluation of an environmental sample etc.

D35-42: Since it reacts specifically with 2, 3, 7, 8-TCDD and 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, said two-sort dioxin homolog in all samples can be measured only by performing easy pretreatment.

[0022]

## II. Standard curve of 2, 3, 7, 8-TCDD

Mixture of mouse ascites diluted with PBS containing 0.1% gelatin (D2-37: 200,000 times; D9-36: 1,000,000 times; D35-42: 400,000 times) and I-5-HRP (0.4 microg/mL) 90 microL and 0.05% triton X-100 solution of 2, 3, 7, 8-TCDD (0.4, 2, 10, 50, 250, 1250



pg/10microL) 10microL was added to each well of the second antibody fixed plate, and it was left at 4 degrees C overnight. It was hereafter operated like the above and the absorbance was measured. As shown in drawing 4, the measurement limitation of 2, 3, 7, 8-TCDD by the ELISA is around 1 pg, and improvement in the sensibility around 100 times was found as compared with the well-known approach.

[0023]

Comparison with well-known monoclonal antibodies

The rate of a crossover with dioxins and the isotype were compared with monoclonal antibodies to dioxins, DD-1, DD-3, DD-4, DD-5 and DD-6, described in the above-mentioned JP 63-14691A (USP No. 4,798,807) and shown in Table 3.

[Table 3]

ハイブ'野'-マ	アイソタイプ*		交差率(2,3,7,8-TCDDを1とした場合)							
	クラス	L 鎖	(1)	(2)	(3)	(7)	(8)	(10)	(17)	
引例	DD-1	IgG1	κ	1.00	6.25	0.10	< 0.01	2.50	0.40	< 0.01
	DD-3	IgG1	κ	1.00	3.13	0.13	< 0.01	3.57	8.33	< 0.01
	DD-4	IgG2a	κ	1.00	20.71	0.03	< 0.01	0.45	5.80	< 0.01
	DD-5	IgG2a	κ	1.00	3.00	< 0.09	< 0.05	10.00	6.00	< 0.05
	DD-8	IgG2a	κ	1.00	1.43	< 0.05	< 0.03	20.00	1.67	< 0.03
本発明	D2-37	IgG2a	κ	1.00	0.19	0.10	0.03	0.26	0.29	0.02
	D9-36	IgG1	κ	1.00	0.48	0.06	0.002	0.23	0.45	0.008
	D35-42	IgG2a	κ	1.00	0.96	< 0.005	0.000	< 0.005	< 0.005	0.0001

(1) : 2,3,7,8-TCDD

(2) : 2,3,4,7,8-PeCDD

(3) : 1,2,3,4,7,8-HxCDD

(7) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDD

(8) : 2,3,7,8-TCDF

(10) : 2,3,4,7,8-PeCDF

(17) : 1,2,3,4,5,6,7,8-OCDF

As shown in Table 3,

(i) the antibodies of this invention differ in the rate of crossover with (2), (8) and (10), as compared with those described in the known reference, and are new monoclonal antibodies.

(ii) Since the antibodies of this invention differ in the rate of crossover with analogous compounds, as compared with those described in the known reference, correlation of measured value and the toxic equivalent differs in toxic evaluation.

(iii) Three sorts of monoclonal antibodies of this invention have the maximum compatibility to (1) 2, 3, 7, 8-TCDD with the strongest toxicity in dioxins, and their compatibility is high similarly to (2) 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, (10) 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF and/or (8) 2, 3, 7, 8-TCDF with a strong toxicity. The dioxin homolog content ratio in biological materials, such as mother's milk, has small individual difference, and since most of all

TEQ(s) (toxic equivalent) are occupied by the homolog of said three sorts (1), (2), and (10), it is possible to carry out monitoring of the TEQ in a biological material by ELISA using this monoclonal antibody. Since especially the rate of a crossover with the dioxin homolog of D9-36 is approximated with TEF (toxic equivalency factor), it has possibility that it is applicable also about the sample from which a homolog content ratio differs. Moreover, since D35-42 recognizes only TCDD and PeCDD, a greatly different environmental sample of each homolog content may also be able to measure said two sorts of homologs. Although stated also in advance, three monoclonal antibodies of this invention have the following descriptions.

D2-37: Since it has the highest compatibility to 2, 3, 7, 8-TCDD, and the rate of a crossover with other homologs is low, it can measure 2, 3, 7, 8-TCDD with the strongest toxicity in dioxins by specific and high sensitivity.

D9-36: Since it has a high compatibility to 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD and 2, 3, 4, 7, 8-PeCDF besides 2, 3, 7, 8-TCDD, it can be used for monitoring of the dioxin toxicity equivalent in biological materials, such as mother's milk. Moreover, since the rate of a crossover with other homologs is also well correlated with TEF, it can be used also for toxic evaluation of an environmental sample etc.

D35-42: Since it reacts specifically with 2, 3, 7, 8-TCDD and 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD, said two-sort dioxin homolog in all samples can be measured only by performing easy pretreatment.

[0024]

#### [Effect of the Invention]

The monoclonal antibodies of this invention can be used for identification of the dioxin contained in the sample, and it can be used for the density measurement of the dioxin in a sample. As an object sample, biological materials, such as tissue of soil, water, fly ash, atmospheric air, and animals and plants, Homo sapiens blood, and mother's milk, etc. can be mentioned. the monoclonal antibodies of this invention, among dioxins, show almost equal compatibility to 2, 3, 7, 8-TCDD and 1, 2, 3, 7, 8-PeCDD with especially strong toxicity. They are so-called group-specific monoclonal antibodies and are useful in the high sensitivity primary simple screening procedure and the toxic monitoring method of dioxin contamination. Since the monoclonal antibody of this invention can supply the thing of fixed quality in large quantities and semipermanently, it is very useful also to development of the immuno affinity extraction method as a simple clean-up method of about establishment of immunoassay, and a test sample for chemical analysis. Moreover, in this invention, the ELISA method is established using the above-mentioned monoclonal antibody, since the measurement region of a standard solution is 1-1000pg, it can carry out the quantum of the dioxin of ultralow volume, and practicality is high [ a region ] to TEQ conversion exposure level evaluation of the dioxin in mother's milk

enough.

[0025]

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is the graph which shows the toxic equivalence multiplier and the rate of a crossover of the monoclonal antibody obtained from the hybridoma D2-37.

[Drawing 2] It is the graph which shows the toxic equivalence multiplier and the rate of a crossover of the monoclonal antibody obtained from the hybridoma D9-36.

[Drawing 3] It is the graph which shows the toxic equivalence multiplier and the rate of a crossover of the monoclonal antibody obtained from the hybridoma D35-42.

[Drawing 4] It is the graph which shows the sensitometry and the range of dioxin (2, 3, 7, 8-TCDD) by the ELISA method using the monoclonal antibody of this invention.

## DRAWINGS

[Drawing 1]

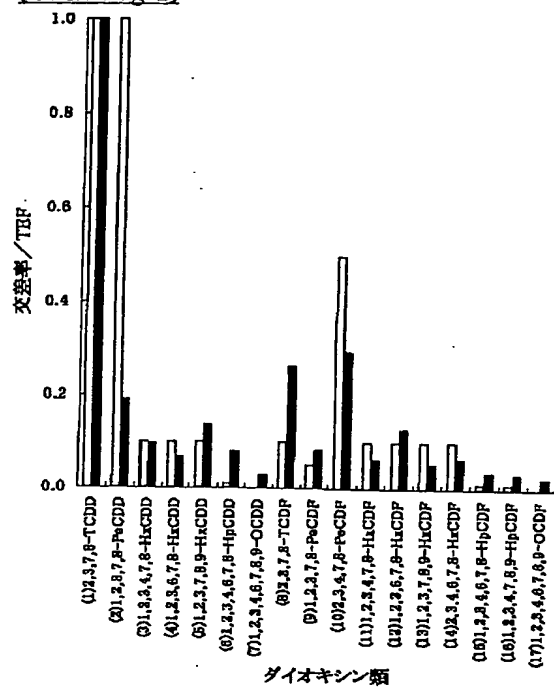


図1 D2-37の交差率(■)とTEF(□)

[Drawing 2]

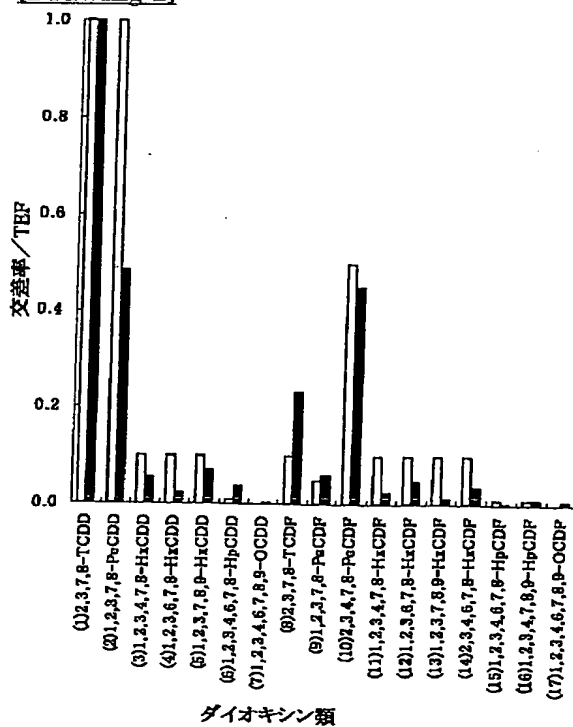


図2 D9-36の交差率(■)とTEF(□)

[Drawing 3]

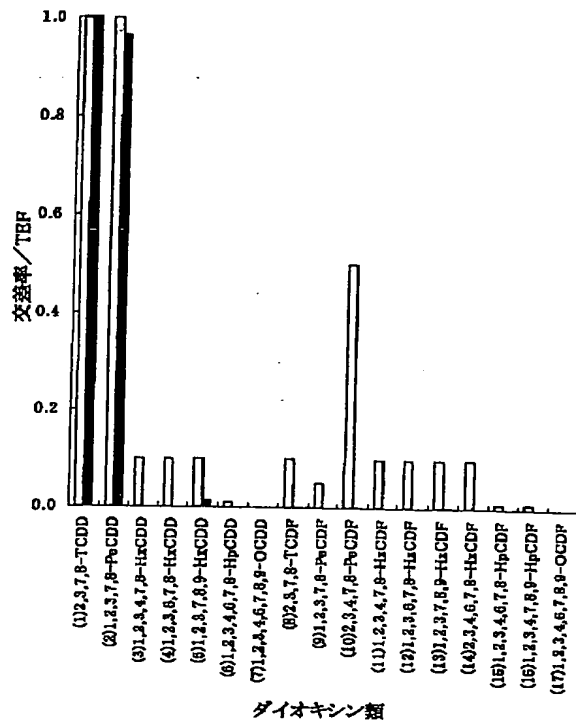
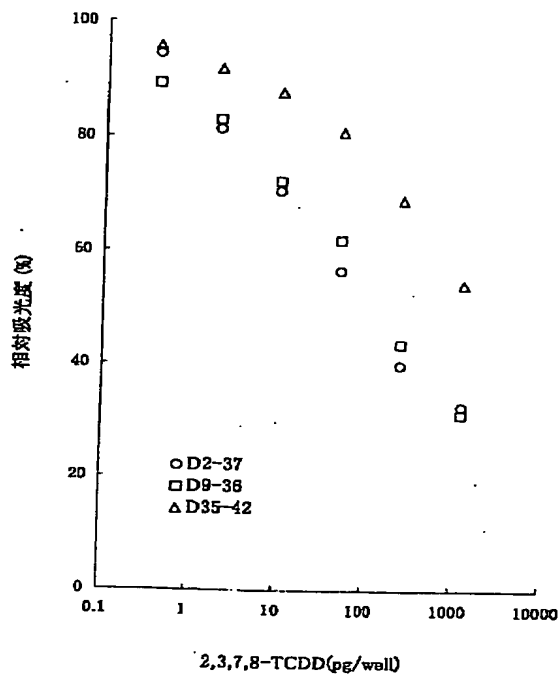


図3 D35-42の交差率(■)とTEF(□)

[Drawing 4]



(図4) 2,3,7,8-TCDD の標準曲線